

I. 緒言

1. PACAP 発見の経緯と構造

神経ペプチド pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) は、1989年に Tulene 大学の Arimura らによって、ラット下垂体細胞のアデニル酸シクラーゼを強く活性化する物質の存在を指標にして、ヒツジ視床下部から抽出された神経ペプチドである (1)。PACAP は 38 残基のアミノ酸からなり、その C 末端がアミド化されている PACAP38 と、PACAP38 の N 末端側 27 アミノ酸を共有し、C 末端がこれもアミド化されている PACAP27 の 2 種類の分子種が存在する (2)。

PACAP は N 末端側 28 個のアミノ酸残基が、消化管ホルモンである vasoactive intestinal polypeptide (VIP) と 68% の相同性を有しているが、アデニル酸シクラーゼの活性化作用は VIP の約 1000 倍以上も強力である。PACAP38 と PACAP27 は、培養ラット下垂体細胞においてアデニル酸シクラーゼを活性化し、growth hormone (GH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), prolactine (PRL) を 10^{-10} M, および luteinizing hormone (LH) を 10^{-9} M という低濃度で分泌促進する作用を持つ。しかしながら、その他の作用は他の視床下部ホルモンに比較

して弱く、follicle stimulating hormone (FSH), thyroid stimulating hormone (TSH) に対しては分泌促進作用は示さなかった (1, 2)。

ヒトにおいても PACAP38 を含有する 63 アミノ酸残基から構成される前駆体が発見され (3)、PACAP は中枢神経系のみならず、広く末梢組織においても存在することが明らかとなった (4)。

PACAP, VIP はアミノ酸の一次構造が glucagon, secretine, gastric inhibitory polypeptide (GIP), peptide histidine isoleucine (PHI) などと類似性を示すことから (5)、グルカゴンスーパーファミリーと総称されている (Figure 1 A)。

2. PACAP と PACAP 受容体の組織分布

2-1. PACAP の組織分布

ラット組織を用いた radioimmunoassay (RIA), enzymeimmunoassay (EIA)により、PACAP は視床下部, 下垂体, 小脳, 海馬などの中枢神経ばかりでなく、精巣, 副腎, 消化管などの末梢組織にも存在することが確認されている (4, 6, 7)。その報告によると、PACAP38 様免疫活性は視床下部に 500~1200 ng/g と最も高濃度に存在し、延髄, 脊髄, 大脳皮質, 小脳には 20~50 ng/g、末梢組織では精巣に 50~110 ng/g と最も多く、ついで副腎に 20 ng/g 存在することが示されている (Figure 1 B)。PACAP27 も種々の臓器に検出されるが、いずれも PACAP38 濃度の十分の一以下と低濃度である。

副腎においては、発生学的に神経外胚葉に由来する髄質部に多く含まれ、副腎皮質の含量と比較して約 24 倍の濃度であると報告されている (8)。さらに、PACAP の局在は免疫組織化学的分析で、副腎髄質ノルアドレナリン産生細胞に存在し、副腎髄質を支配している神経繊維には存在しないという報告 (9) と、逆に神経繊維のほうに存在するという報告があり (10)、現在では神経繊維に存在し副腎髄質を神経性に調節していると考えるのが一般的である。また、副腎

髄質の腫瘍である褐色細胞腫組織中に高濃度の PACAP 様免疫活性が見られることが報告されている (11)。

2-2. PACAP 受容体と組織分布

PACAP の生理作用は形質膜に存在する PACAP 受容体を介して発揮されるが、種々の組織への PACAP 親和性により PACAP 受容体の研究が行われた。Gottschall らは、PACAP と VIP の両方が特異的に結合する領域が、肺、肝、十二指腸、胸腺にあることを発見した。しかし、視床下部や下垂体においては、PACAP は強い結合性を示すにもかかわらず VIP との結合性が非常に低いことを報告した (12)。Shivers らは、さらに検討を加え、下垂体前葉、視床下部、脊椎、副腎髄質、精原細胞および精子に PACAP に特異的な受容体を見だし、PACAP type I 受容体と名付けた。また、肺、肝、腸管などに存在する PACAP と VIP が共有している受容体を type II 受容体と命名した (13)。type I 受容体は、神経芽腫由来細胞株の NB-OK 細胞やラット副腎髄質褐色細胞腫由来の PC12 細胞にも存在することが報告されている (14, 15)。

Robberecht らは、ラット悪性膵腺房細胞株 AR-2J 細胞の細胞膜の分析で、PACAP38、PACAP27 の両方に高親和性 (K_d 0.3 nM) で結合する PACAP-A 受容体と、

PACAP38には高親和性で結合するが、PACAP27には低親和性 (K_d 30 nM) の PACAP-B 受容体を明らかにした (16)。その後、Hosoya らは、PACAP type I 受容体のサブタイプとして、type I-A, type I-B を報告した (17)。

2-3. PACAP 受容体のクローニング

1993 年には、PACAP type I 受容体遺伝子が相次いでクローニングされた。Joseph らは、AR-2J 細胞の cDNA ライブラリーから、VIP 受容体 cDNA を使用したクロスハイブリダイゼーションによって PACAP type I 受容体を分離した (18)。Morrow らは、セクレチンファミリー受容体の第3, 第7膜貫通ドメイン領域に関連するオリゴヌクレオチドプライマーでラット下垂体 cDNA の polymerase chain reaction (PCR) を用いて、ラット嗅神経球 cDNA ライブラリーから (19)、また、Hashimoto らは、ラット VIP 受容体 cDNA を用い、ラット脳 cDNA ライブラリーとのクロスハイブリダイゼーションでクローニングし、リコンビナント PACAP 受容体を COS 細胞に発現させ、PACAP によるアデニル酸シクラーゼ活性化がVIP よりも約 1000 倍高いことを証明した (20)。

これまでにクローニングされていた VIP 受容体 (21) との比較では、PACAP type I 受容体と VIP 受容体のアミノ酸構造は、約 50% の相同性が認められた。

PACAP type I 受容体は 495 アミノ酸残基から構成されている蛋白質で、7 回膜貫通型の G 蛋白にリンクした受容体であり、Gs 関連スーパーファミリー受容体として分類されている (18)。最近、Inagaki らは、3 番目の PACAP 受容体となる PACAPR-3 をマウスのインスリン分泌細胞株 MIN6 細胞から発見した。この受容体は type I 受容体と約 50% の相同性を持ち、アミノ酸 437 残基からなる受容体で、他のインスリン分泌細胞や肺、脳、胃などでも中等度に発現している (22)。

3. PACAP の作用と副腎髄質ホルモンの分泌・合成

3-1. PACAP の作用

PACAP は培養ラット下垂体細胞における強力なアデニル酸シクラーゼ活性化作用を指標に見いだされており、cAMP 産生と引き続いて生じる GH, ACTH, PRL, LH の分泌促進作用が確認された (1, 2)。さらに、PACAP の作用は *in vitro* での研究で進展し、interleukin-6 産生促進 (23)、腓アミラーゼ分泌促進 (24)、インスリン分泌促進 (25)、胃内分泌系ではソマトスタチン分泌促進、ガストリン分泌抑制 (26) などが報告された。

また、血管に対する作用としては、ラットによる *in vivo* の実験で PACAP には急速で一過性の降圧効果があることが示され (27)、また、ウサギ胸部大動脈においては、血管内皮細胞非依存性の持続的な血管弛緩作用が認められ (28)、血圧降下にも関与することが示されている。

PC12 細胞においては、ドーパミン分泌促進作用が報告され (15)、副腎に対する効果は、ラットクロム親和性培養細胞からのアドレナリン分泌作用が示された (8)。われわれの研究室では、PACAP が培養ブタ副腎髄質細胞に対してカテコールアミン分泌促進すること、その作用が電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介し

た細胞外 Ca^{2+} の流入により生じることを明らかにした (29)。現在では、副腎髄質からのカテコールアミン基礎分泌は PACAP により制御されていると考えられている。

PC12 細胞を用いた実験では、PACAP がアデニル酸シクラーゼ活性による cAMP 蓄積作用だけでなく、ホスホリパーゼ C 活性促進作用を持ち、神経突起様構造の成長を誘導することが示され、神経細胞への分化に作用した。この報告によれば、PACAP27 と PACAP38 の作用が、cAMP 産生では同等であるが、ホスホリパーゼ C 活性化においては PACAP38 のほうが 10~100 倍強力であったとしている (30)。

このように、PACAP はその受容体を介して、cAMP 産生、ホスホリパーゼ C 活性化によるイノシトールリン脂質代謝、細胞外 Ca^{2+} の流入という 3 系統のセカンドメッセンジャー系を同時に動かし、さまざまな細胞応答に関与していることが示されている。

3-2. 副腎髄質ホルモンの分泌と合成

副腎髄質には、カテコールアミン、プロエンケファリン、種々の神経ペプチドなど多数の生理活性物質が存在しており、これらは共に貯蔵され、また、

放出される (31)。カテコールアミンとは、カテコール核とエチルアミンあるいはエタノールアミン側鎖を持つ生体アミンの総称であり、ドーパミン、ノルアドレナリン（ノルエピネフリン）、アドレナリン（エピネフリン）を指す。ヒトでは副腎髄質から産生・放出されるカテコールアミンの約 80%はアドレナリンである。カテコールアミンの分泌は、低血糖、出血、酸素欠乏などさまざまなストレスにより促進される。副腎髄質では、このようなストレス反応が交感神経性に内臓神経を介して伝えられることによりカテコールアミンの放出が起こる。このときの神経伝達物質はアセチルコリンであり、細胞膜上に存在するアセチルコリンニコチン作動性受容体に結合することにより、細胞膜の脱分極が生じて Ca^{2+} が細胞内に流入する。この細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇によって、カテコールアミン分泌顆粒が形質膜まで移動、融合して顆粒内容物が細胞外に放出される。このような分泌形態は開口放出 (exocytosis) と呼ばれている。

副腎髄質細胞内でのカテコールアミン生合成は、まず細胞に取り込まれたチロシンが、チロシン水酸化酵素 [TH; L-tyrosine, tetrahydropteridine: oxidoreductase (3-hydroxylating), EC 1.14.16.2] の作用でドーパとなる。この TH 酵素活性は他のカテコールアミン合成酵素反応に比較して非常に低く、

カテコールアミン合成反応の律速段階であると考えられている。次いで、芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素 [ADC; aromatic-L-amino acid decarboxylase, EC 4.1.1.28] によりドーパミンが作られ、顆粒内に取り込まれる。ドーパミンはそこで、ドーパミン- β -水酸化酵素 [DBH; 3,4-dihydroxyphenylethylamine, ascorbate: oxygen oxidoreductase (β -hydroxylating), EC 1.14.17.1] の働きでノルアドレナリンとなる。さらに、副腎髄質アドレナリン産生性細胞にはフェニルエタノールアミン-N-メチル基転移酵素 [PNMT; S-adenosyl-L-methionine: phenylethanolamine-N-methyltransferase, EC 2.1.1.28] が存在し、ノルアドレナリンからアドレナリンへの転換が行われる。

4. カテコールアミン合成系と律速酵素 Tyrosine hydroxylase (TH) の 発現調節

ストレスによる神経性の刺激は、カテコールアミン分泌促進ばかりでなくカテコールアミン生合成にも作用することが示唆され (32)、特にカテコールアミン生合成の律速酵素である TH 調節機構に注意が向けられた。TH の短期的な調節は、cAMP 依存性プロテインキナーゼ (protein kinase A; PKA), PKC および Ca^{2+} /カルモジュリンキナーゼ II による TH 触媒領域のリン酸化の関与が報告された (33)。カテコールアミン生合成の長期的な調節は、カテコールアミン合成酵素の遺伝子発現により行われ、このことはラット副腎髄質の TH mRNA 発現増加が持続的な寒冷ストレス (34) やレセルピン処理によるカテコールアミン枯渇 (35) などで証明された。ストレス反応後の副腎髄質で cAMP の増加が認められたことから、セカンドメッセンジャー cAMP の作用が TH 発現に重要だと考えられた (36)。そして、PC18 細胞, PC12 細胞, ウシ副腎髄質細胞において、cAMP ならびにグルココルチコイドの実験により TH mRNA 発現増強が報告された (37, 38, 39)。しかし、アセチルコリンニコチン作動性受容体はアデニル酸シクラーゼとは直接リンクしていない。そこで、アセチルコリンおよびニコチンに

よる副腎髄質細胞刺激実験が行われ TH mRNA 発現増加が確認され、それが二次的な cAMP 増加によることが示唆された (40)。一方、ストレスによるアセチルコリンニコチン性受容体を介する経路とは異なる調節経路が考えられ、アデニル酸シクラーゼを活性化する VIP による TH 発現効果が報告された (41)。さらに、TH 遺伝子の長期的調節作用はさまざまな神経因子、ホルモン性因子、成長因子により確認され (42, 43, 44)、また、PKC, Ca²⁺/カルモジュリンキナーゼ II の関与も報告がある (45, 46)。さらには TH に限らず DBH, PNMT の遺伝子発現調節の報告も多数なされている (47, 48, 49)。われわれの研究室では、PACAP が培養ブタ副腎髄質細胞に対して TH, DBH mRNA 発現を用量依存性に増強することを示し、その効果が cAMP の蓄積と PKC 活性化のセカンドメッセンジャー経路に依存することを報告している (50)。最近においても、我々と同様に、PACAP による TH, DBH 遺伝子発現効果が PKA, PKC 活性化経路によることが示され (51)、依然として PACAP による TH 発現調節に興味をもたれている。

5. TH 遺伝子発現と初期応答転写因子

遺伝子の発現調節は、普遍的な基本転写因子と細胞・遺伝子特異的な転写調節因子により制御されており、通常、転写開始点の上流 5'-flanking 領域に存在する転写調節シスエレメントと呼ばれる DNA コンセンサス配列にトランスに作用する転写調節因子が結合し、RNA ポリメラーゼ活性を持つ基本転写因子との相互作用により行われる。シスエレメントとトランス転写因子の組み合わせにより特異的な遺伝子発現が制御され、組織・細胞種特異性なども規定される。

カテコールアミン合成の律速酵素 TH 遺伝子についても 5'-flanking 領域の解析がなされており、数種類のシスエレメント [AP-2, TRE (AP-1), POU/Oct, Sp-1 (GC box), CRE など] が同定されている (52, 53, 54, 55) (Figure 2)。ヒト, ラット, マウスにおいてホモロジーは高く、各シスエレメントも種を越えて保存されている。その中でも cAMP 依存性に転写調節にかかわることで知られるモチーフに CRE があり (56)、ラット TH 遺伝子の発現調節に直接関与することが示された (57, 58)。一方、同じラット TH 遺伝子の転写調節には、CRE を含まない AP-2, TRE, E-box を持つフラグメントが関与し、特に TRE による

発現制御が指摘された (59, 60)。転写調節因子 activating protein-1 (AP-1) は初期応答遺伝子産物である Fos, Jun ファミリーから成る二量体で、PKC や細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により活性化される。ラット副腎やラット神経節において、アセチルコリン分泌を刺激するカプサイシンの添加やニコチンによるアセチルコリン受容体の刺激によって Fos, Jun ファミリーが発現・活性化するという報告がある (61, 62)。PC12 細胞の NGF 刺激は、神経細胞への分化に作用するが、このときの TH 発現亢進には c-Fos と FosB が発現し TRE (AP-1) サイトで相互作用するとされ、ここに c-Jun を強制的に発現させると TH 遺伝子転写を阻害することが報告された (63)。神経芽腫細胞の SK-N-BE 細胞における TH 遺伝子転写には、CRE と TRE (AP-1) の両者が関与し (64)、マウスのカテコールアミン産生性中枢神経細胞 CATH と末梢神経細胞 PATH においては、CRE による調節が主体であった (65)。このように、同じ TH 遺伝子の転写制御でも、細胞種による相違や転写調節因子の微妙な蛋白種の違いにより発現特異性がコントロールされている可能性が考えられる。

6. 本研究の目的

ヒツジ視床下部から発見された神経ペプチド PACAP は強力なアデニル酸シクラーゼ活性化作用を持ち、ホルモン分泌促進、血管拡張、精子形成、細胞分化など多彩な生体反応に関与している。PACAP の組織分布は、末梢組織では副腎髄質に多量に存在しており、PACAP 特異的な type I 受容体の存在も確認されている。われわれは、これまでに PACAP がカテコールアミン分泌促進作用を持つことを確認している (29)。さらに、PACAP が長期的なカテコールアミン合成に作用することを予測し、培養ブタ副腎髄質細胞の実験系において TH, DBH 遺伝子発現増強効果を検討してきた (50)。実際、PACAP は用量依存性に TH, DBH mRNA 発現を増強し、経時的な発現変化を示した (Figure 3, 4)。また、この作用が cAMP および PKC セカンドメッセンジャー系によりシグナル伝達されることを確認した。

次なる疑問は、PACAP のシグナル伝達と TH 転写調節との間に作用する特異的な制御機構の解明に向けられた。通常、遺伝子発現の調節は、初期応答遺伝子が発現し転写調節因子として標的遺伝子の転写調節領域と相互作用することにより行われる (66, 67, 68)。多くの細胞活性化要因において、たとえば、細胞

分化・細胞増殖時の早期シグナル伝達に関与する転写調節因子の代表に Fos, Jun ファミリー核蛋白が知られている (69, 70, 71)。これら Fos, Jun ファミリー核蛋白は塩基性ロイシンジッパー構造を持ち、二量体として DNA と結合する。Jun ファミリーには、c-Jun, JunB, JunD の 3 種類がありホモ二量体構造で TRE に結合する。Fos ファミリーは、c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2 の 4 種類が知られ、Jun ファミリー蛋白とヘテロ二量体構造を形成して TRE に結合する。Fos/Jun 複合体は AP-1 と呼ばれ、細胞表面から発生するある種のタイプのシグナル伝達カスケードにおける最終段階として標的遺伝子発現の制御に関与する。すなわち、PACAP のような活性化因子が細胞表面の受容体に結合することにより生じるプロテインキナーゼ活性化が AP-1 蛋白を発現し特異的な遺伝子の発現をもたらす機構が存在する (72, 73)。AP-1 蛋白は、また、TRE 配列に類似する CRE に作用することが考えられ、CREB とのクロストーク反応の報告がある (74, 75)。

TH 遺伝子発現調節においては、さまざまな刺激による初期応答遺伝子の関与が報告されている (60, 63, 64, 65, 76, 77)。また、TH 遺伝子 5'-flanking プロモーター領域には、TRE (AP-1), AP-2, POU/OCT, SP-1, CRE などのモチーフが明らかにされている。これらのシスエレメントは種を越えて保存されており、

TH 遺伝子発現制御に重要だと考えられている。実際には、NGF によるラット TH 発現には TRE が、フォルスコリンによる発現には CRE が関係するなどの報告がある (78, 79)。

これまでに TH 発現調節に関する報告は多数あるが、転写調節についての知見はまだ十分とはいえない。また、PACAP による TH 遺伝子発現の制御機構については転写調節因子に関する詳細な検討がない。したがって、今回は、PACAP が動かすセカンドメッセンジャー経路を考慮し、初期応答遺伝子の動態と TH 遺伝子プロモーター領域の TRE および CRE と転写調節因子との関連について検討した。